

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-126074

(43)Date of publication of application : 27.04.1992

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 3/00

(21)Application number : 02-242449

(71)Applicant : BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 14.09.1990

(72)Inventor : WATANABE YOSHIKI

(54) SUBSTRATE FOR CULTURE OF TISSUE CELL**(57)Abstract:**

PURPOSE: To provide a culture substrate for tissue cell enabling the culture in a state close to the culture in vivo by forming regions composed of a polysaccharide and having different cell specificities on a plastic substrate using the technique of photo-lithography.

CONSTITUTION: A pattern of a photo-resist is formed on a plastic substrate such as polysulfone, polyether sulfone, polymethylpentene and polyester. The pattern is treated with ammonia plasma and made to react with a mixed solution of a water-soluble condensation agent [e.g. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide hydrochloride] and a polysaccharide containing carboxyl group. Concrete examples of the polysaccharide are heparin, chondroitin sulfate, hyaluronic acid, alginic acid and carboxyl methyl chitin. The photo-resist is removed to obtain a culture substrate for tissue cell (e.g. hepatocyte).

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-126074

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)4月27日

C 12 N 5/06

C 12 M 3/00

Z

9050-4B

7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑮ 発明の名称 組織系細胞の培養に用いる基質

⑯ 特 願 平2-242449

⑰ 出 願 平2(1990)9月14日

⑱ 発 明 者 渡 辺 芳 明 神奈川県横浜市区田谷町1番地 株式会社バイオマテリアル研究所内

⑲ 出 願 人 株式会社バイオマテリアル研究所 神奈川県横浜市区田谷町1番地

⑳ 代 理 人 弁理士 遠山 俊一

明 細 書

1. 発明の名称

組織系細胞の培養に用いる基質

2. 特許請求の範囲

(1) プラスチック基質に、フォトレジストのパターンを形成し、アンモニアプラズマ処理を行った後、水溶性塩金剤とカルボキシル基を含む多量の炭素を反応させ、最後にフォトレジストを除去することを繰り返して製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2) プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルペンテンまたはポリエーテルであることを特徴とする請求項1に記載の組織系細胞の培養基質。

(3) 水溶性塩金剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-エチルヘリノエチル)カルボジイミド-パーオキシカルボン酸塩であることを特徴とする請求項1項記載の組織系細胞の培養基質。

(4) カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルキチンであることを特徴とする請求項1項記載の組織系細胞の培養基質。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、生体の組織系細胞を体外において培養しようとする際に用いる培養基質に関するものであり、細胞が外部環境を認識し接着、増殖するという細胞の機能を生かした新規培養基質に関するものである。

(従来技術)

組織細胞とは、例えば、肝細胞、腎細胞、筋肉細胞、皮膚細胞、血管内皮細胞など生体の組織を構成する細胞をいう。これに対して、血液細胞とは、浮遊状態で血管、リンパ管内を移行する好中球、単球等をいう。組織細胞は、血液細胞とは異なり一定の部位に定在し、分化し、増殖を行い機能を果たす。体外で培養を行う場合も同様であり、

特開平4-126074 (2)

並発芽細胞は、培養液（以下培養という）中で芽生したまま増殖するが、細胞系細胞は、顕著する培養がなくては増殖してこない。

培養時に用いる基質としては、通常、ガラス、表面処理したプラスチック等をそのまままたはコーティング、ポリリジン、フィブロネクチン等をコートして使われている。これらの基質では、その表面上に均一に細胞が接着し、増殖してくる。

（発明が解決しようとする課題）

生体内において、細胞系は、特定の配列構造をとっており、一定にただ広がっているわけではない。それぞれの組織特有の構造体となっている。この構造は、各細胞のまたは細胞群の機能と密接に結びついている。これまで用いられてきた培養基質は、基質上に均等に細胞接着が起こり、生体内で細胞ののかれた状態とは異なるものである。細胞を生体内にとり出して培養し、生体内の場合と同様の働きをさせるためには、より生体内に近い環境を与え、一定の形態なり構造体にして培養することが必要である。

この方法として種々の方法が考えられるが、単なる均一な表面の培養基質ではなく、細胞の接着特性の異なった構造を細胞レベルで形成することにより一定の形態を示させ得ることが可能と考えられた。また、細胞を培養する場合の基質は、非毒性であることが必要である。例えば、培養に用いる培地を調製する際に使う米もイオン交換、濾過、マイクロフィルトレーションなどの方法で不純物を極力除いた純度の高いものが必要である。つまり、培養基質の場合も同様の考慮が必要である。有害成分等の抽出はいうまでもなく、細胞毒性のある表面構造も避けなければならない。

そこで、本発明者は、細胞毒性の非常に少ない天然物の多量類を用いることを検討したところ高い有用性を示すことが判明した。また、前記の細胞特性の違った領域の形成にはフォトリソグラフィの手法を応用することが可能であるとの知見をした。

本発明の組織系細胞の培養に使用する培養基質は、これらの方法をさらに詳細に検討した上、完

成に至ったものである。

即ち、本発明は、組織系細胞を、従来の単一平面上の培養に比してより生体内に近い培養を行うことができると共に、細胞毒性の非常に少ない新規培養基質を提供することを目指すものである。

（課題を解決するための手段）

このような目的を達成するための本発明の構成は、以下の(1)～(4)の技術的な手段から成るものである。

(1)プラスチック基質に、フォトリソスのパターンを形成し、アンモニアプラズマ処理を行った後、水溶性縮合剤とカルボキシ基を含む多量の濃度を反応させ、最後にフォトリソスを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2)プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルペンテンまたはポリエーテルであることを特徴とする前記(1)記載の組織系細胞の培養基質。

(3)水溶性縮合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド-2-ホルミル-2-エチル、カルボジイミド-パラ-トルエンスルホン酸であることを特徴とする前記(1)記載の組織系細胞の培養基質。

(4)カルボキシ基を有する多環が、ヘブリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースであることを特徴とする前記(1)記載の組織系細胞の培養基質。

本発明において、使用されるプラスチック基質は、フォトリソスをコートしてパターン形成することができる材質であればいづれのものを採用してもよいが、フォトリソス液に含まれる溶剤に対する耐溶剤性、レジストを乾燥する際に必要とされる熱に対する耐熱性等が必要である。また、細胞を培養した後、細胞を観察することができるといふ観点から透明性の高いものが好ましい。このようなことから、ポリエーテルスルホン、ポ

特開平4-126074(3)

リスルホン、ポリメチルベンゼン、ポリエスチル等が好ましい。形状は、フォトレジストをコートする点、細胞を培養する点から、シート状、フィルム状が好ましい。厚さは、特に限定されるものではないが、取扱が易さから50～1000 μ m程度が好適である。

フォトレジストは、半導体素子作製用に使われている高解像度のものがすべて使用されるが、ボジ型フォトレジストであるノボラック・ジエチル・エチル型が使い易く、かつ各社から多数の品種が上市されている点で好適であるが、プラスチック基質の耐腐蝕性を考慮してより適切なものを使用すればよい。

パターンの形状、幅、長さは、特に限定されるものではないが、超微細構造の製造間隔相互作用による機能発現を考慮に入れるならば、単一細胞程度の大きさで不適当である。数十～数百 μ mが適当である。

フォトレジストは、スピナー法によりコートして、市販の露光装置を用いて所定のパターンを

露光する。露光パターン部を除くベーク層を付与して、フォトレジストのパターンを形成する。各条件はレジスト種により異なるため、それぞれの最適条件で行う。フォトレジストのパターンを形成したプラスチック基質にアンモニアの低濃度プラズマ処理を行いプラスチック基質表面にアミノ基を導入する。プラズマ処理の条件は、0.01 Torr 程度に減圧したチェンバー内にアンモニアガスを導入し、0.95～0.9 Torr の圧力にして、5～100 W の電力となるように電力を印加し、0.1～5分処理する。12.56 MHz の高周波を用いることが望ましい。なお、プラズマ処理装置の種類、電極間距離、チェンバーの大きさ等により特性が異なるため適切な条件を選定して行えばよい。

次に、この処理基質を水溶性重合剤とカルボキシル基を含む多量の糖類と反応させる。水溶性重合剤は0.5～10%、カルボキシル基を含む多量糖は0.1～5%が好適である。4℃で20時間の温度で、10～20時間反応させる。水溶性重合剤としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピ

ル)カルボジイミド塩酸塩、またはN-エチル-3-カルボジイミド-N'-[2-モルホリノエチル)カルボジイミド]パラートエチルホルン酸塩が好適である。カルボキシル基を含む多量糖は、天然物、合成物等種々のものが知られている。細胞に有害な作用を及ぼさないものが良いのは当然であるが、天然物を多く含むものや作用が不明確なものは不適当である。

また、細胞に対する物理的な接着、非接着の作用を持たないものも不適当である。なぜならば、細胞に対して特異性の違った膜を作り出すことができるからである。以上の点からカルボキシル基を含む多量糖として、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルキチンが好適である。反応が終了したら、最後にフォトレジストの除去を行うために、エタノールまたはメタノール中に上記基質を浸漬し、超音波洗浄を行う。1～5回洗浄した後、純水でリンスする。このようにして調製した基質は4℃のリン酸緩衝液中で安定に

保存することができる。

実施例1

プラスチック基質として、100 μ m厚さの10cm \times 10cmのフィルムを用いた。材質は、ポリエチレンホルン、ポリスルホン(いずれも住友ベークライト社製)の2種を用いた。

このプラスチック基質に、ボジ型フォトレジストOPFR-5000(東京応化工業社製)をスピナー法により膜厚1.5 μ mにコートした。露光装置NSR-4505434(エコン社製)を用いて、直径50 μ mの円形、パターンをフォトマスクで露光し成形した。露光時間は、150ms、現像液N40-1(東京応化工業社製)で露後洗浄、80℃で20分乾燥した。この基質をプラズマ装置(サムコ社製PB-105)を用いてアンモニアプラズマ処理した。0.01 Torr に減圧後、アンモニアガスを導入し、0.2 Torr で50 W、2分処理した。

次に、この基質を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピル)カルボジイミド塩酸塩10%水溶液とヘパリン、ヒアルロン酸、カルボキシル

特開平 4-126074 (4)

メチルサテンの20%水溶液を、それぞれ蒸留した水増液と反応させた。4℃で18時間反応後、純水で洗浄、そして、エタノール中に浸漬し、超音波洗浄を1回/2分で、2回行った。純水で洗浄後、リン酸緩衝液中に保存した。

1は角に上記フィルムを切ったサンプル片を12ウエルプレートに入れて組織系細胞の培養を行った。細胞は肝臓の前駆 であるH4IIC(ラット由来)を用い、 5×10^3 個/皿の細胞濃度の液を1皿/ウエル加え1週間培養した。培養は中性に調整したDMEM(日本製薬社製)にグルタミン(日本製薬社製)を0.3g/l、牛胎児血清10%、馬血清10%となるように加えたものを使用した。

培養2日目には、いずれの条件で調整した基質でも、形成したパターンと同じ培養形態をとっていることが観察された。さらに7日目には、立体的な気泡が二次元的パターンで形成されていることがみとめられ、生体内に近い培養環境となっていることが認められた。

実施例 2

以下、実施例により本発明とさらに具体的に説明する。

弁理士 遠山俊一

平 統 排 正 書

平成3年6月10日

特許庁長官 植 松 敏 殿

1. 事件の表示

特願平 2-242443 号

2. 発明の名称

組織系細胞の培養に用いる基質

3. 補正をする者

事件との関係 特 許 出 願 人

横浜市長区田谷町1番地
株式会社バイオマテリアル研究所
代表取締役 中 原 恒 彦

4. 代理人

〒105 東京都港区虎ノ門1丁目9-10
遠山俊一 TEL 508-6876
(6945) 弁理士 遠山俊一

5. 補正命令の日付

平成3年5月14日(発送日)

6. 補正の対象

発明名称を「組織系細胞の培養に用いる基質」と明記する。

6. 補正の内容

別紙の通り

(別 紙)

明細書中、誤字がありましたので下記の通り修正します。

2. 特許請求の範囲

(1)プラスチック基質に、フオトレジストのパターンを形成し、アンモニアプラズマで処理を行った後、水溶性重合剤とカルボキシシル基を含む多量の炭素を含有させ、最後にフオトレジストを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2)プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルペンテンまたはポリエーテルであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(3)水溶性重合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-バラートリエンスルホン塩であることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(4)カルボキシシル基を有する多糖が、ヘパリン、

スルホンを「カルボジイミド-バラートリエンスルホン酸塩」と訂正。

同頁5行、10行「前記(1)記載」を「前記(1)項記載」と訂正。

第7頁8行「すべて使用されるか、」を「すべて使用できるが、」と訂正。

第10頁1行「露光し成形し」を「露光し形成し」と訂正。

第11頁6行「肝臓の細胞である。H4TQ」を「肝臓の細胞性である「H4TQ」と訂正。

同頁下から4行「～な電場が」を「～な電場」と訂正。

第12頁4行「(2-モルホリノカルボジイミド～」を「(2-モルホリノエチルカルボジイミド～」と訂正。

同9行「DMEF/P12」を「DMEF/12」と訂正。

第15頁1行～2行「以下、実施例により本発明とさらに具体的に説明する。」を削除します。

特開平4-126074 (5)

コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシメチルキチンであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

2頁14行「組織細胞とは、」を「組織系細胞」に訂正。

2頁15行「血管内皮細胞」を「血管内皮細胞」と訂正。

同頁14行「組織細胞とは、」を「組織系細胞」に訂正。

同頁下から3行～2行「組織細胞は血管細胞とは異なり一定の状態で定在し、分化し、増殖」を「組織系細胞は血管系細胞とは異なり一定の状態で定在し、分化、増殖」と訂正。

明細書第8頁4行「通常、ガラス」を「通常、ガラス」と訂正。

同頁下から3行「働きをさせるためには、」を「働きを強めるためには、」と訂正。

第5頁下から2行「前記(1)記載の」を「前記(1)項記載の」に訂正。

第6頁4行「カルボジイミド-バラートリエン